



产品说明书

T_{NT}[®] T7 Quick For PCR DNA

产品L5540 说明书

www.promega.com

全部技术文献均可在因特网上得到 www.promega.com/tbs

请访问该网站以保证您所使用的是这份技术报告的最新版本。如对此方法的使用有任何疑问，请联系 Promega 技术服务部门。发送电子邮件至 chinatech@promega.com.cn。

I. 概述	2
II. 对 PCR DNA 模板的考虑	3
III. 产品成分及储藏条件	3
IV. 一般考虑	4
A. 创建一个无 RNA 酶的环境	4
B. 裂解液的处理	4
V. 转录/翻译步骤	4
V.A. TNT® T7 Quick for PCR DNA 反应的通用操作方案	5
VI. 蛋白翻译后分析	6
VI.A. 放射性标记参入百分率的确定	7
VI.B. 翻译产物的变性胶分析	8
VII. 常见问题	9
VIII. 参考文献	10
IX. 附录	10
IX.A 溶液的配制	10
IX.B 相关产品	错误！未定义书签。

I. 概述

试剂盒 TNT® T7 Quick for PCR DNA^(a-d) 是可以方便, 快速, 最优地表达 PCR 模板, 是偶联的转录/翻译系统。对大多数 PCR 模板而言, 该试剂盒可产生比其它商业化试剂盒高五倍的蛋白量。PCR 产生的 DNA 可在扩增反应后直接用于蛋白的表达。来自标准的扩增操作及商品化试剂盒的 PCR 产物均已被成功地进行了测试 (如: Access RT-PCR System [Cat.# A1250], GoTaq® DNA Polymerase [Cat.# M3001], Roche Diagnostics High Fidelity 和 Expand™ Long Template PCR Systems, 和 Invitrogen Platinum Taq)。该系统可用于任何 PCR 扩增方案。PCR 产物可在扩增反应后直接用于该试剂盒进行蛋白的表达而无需纯化。

在使用 TNT® T7 Quick for PCR DNA 时, 将包含 T7 启动子的 PCR 产物加到该产品的 TNT® T7 PCR Quick Master Mix 中, 然后于 30°C 孵育 60-90 分钟。合成的蛋白可通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 见 VI.B 部分) 结合放射自显影 (autoradiography) 或光成像 (phosphorimaging) 加以检测。

欲参考使用该产品发表的文章, 请访问: www.promega.com/citations/

II. 对 PCR DNA 模板的考虑.

TNT® T7 Quick for PCR DNA非常利于直接分析PCR产物。合成的蛋白的质量取决于模板PCR产物是否条带独立，清晰而且特异性好。引物的选择是实验过程重要的第一步，现在许多研究人员借助计算机软件的协助进行扩增引物的设计。在Promega被成功使用的这类软件包括：OLIGO®和引物选择专家序列分析软件（Primer Select expert sequence analysis Software）。由于不同热稳定DNA聚合酶可能需要不同的反应条件，因此我们建议每个PCR反应都需要进行条件优化。然而，通常情况下，标准扩增操作就能满足需求了。常见的问题包括：PCR产物产量低、没有获得PCR产物以及由于引物杂交而形成的“引物二聚体”（其与模板竞争引物并影响模板的扩增量）。

在选定了互补的寡核苷酸后，需要在其5'端添加额外序列，包括：一个用于DNA模板转录的噬菌体聚合酶启动子、为确保RNA高效翻译的Kozak序列（如果模板没有此序列）。通常，当从一个靶cDNA的5'非翻译区（UTR）扩增基因时，天然的Kozak序列是存在的^[2]。然而，当翻译从一个内部起始密码子（AUG）开始时，应加入Kozak保守序列（Kozak consensus sequence），以利于蛋白质的优化表达（图1）。最近有文献报道在Kozak序列内部有基因多态性（polymorphism）现象，而某些序列能增强体外和体内蛋白翻译效率^[3]。最后，我们建议在T7共有序列的上游添加一些额外的寡核苷酸以确保高效的RNA生产。PCR反应的通用条件可在许多资料上找到，比如：PCR protocol^[4]。扩增后，很重要的一点是需要通过琼脂糖凝胶电泳分析样品以确保PCR产物被正确扩增并无杂带。PCR产生的DNA片段可直接用于TNT® T7 Quick for PCR DNA反应而无需纯化。

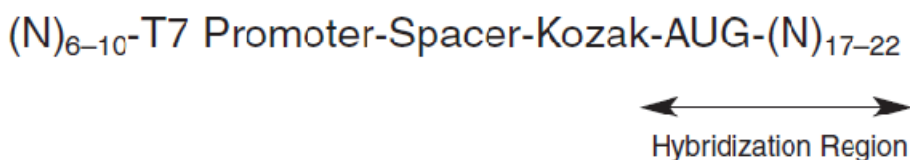


图1. 5' PCR引物的设计

III. 产品成分及储藏条件

Product	Size	Cat. #
TNT® T7 Quick for PCR DNA		L5540

仅用于实验室研究。每一试剂盒包含充足的试剂量以实现大约40 × 50 μl的翻译反应。包括：

- 1.6ml TNT® T7 PCR Quick Master Mix (8 × 200 μl)
- 50 μl Methionine, 1mM (甲硫氨酸)
- 1.25ml Nuclease-Free Water (无核酸酶的水)

储藏条件及稳定性: 保存所有试剂盒成分于 -70°C 。产品对 CO_2 敏感。因此, 应避免产品较长时间暴露于空气中, 另外, 反复冻融对产品活性/性能产生不良影响。

IV. 一般考虑

A. 创建一个无 RNA 酶的环境

为减少核糖核酸酶(RNase)的污染, 进行实验时应该带上手套, 微离心管(microcentrifuge tubes)和枪头(pipette tips)应该是无核糖核酸酶(RNase-free)的。不必向TNT® T7 PCR快速反应中额外添加重组RNasin®核糖核酸酶抑制剂(Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor)以抑制RNA降解, 因为试剂盒的反应预混液(TNT® T7 PCR Quick Master Mix)中含有核糖核酸酶抑制剂。

B. 裂解液的处理

除了实际的转录/翻译反应外, 对该试剂盒的所有实验操作都应在 4°C 进行。任何未使用的Master Mix融化后尽可能快的重新冷冻存放以减少翻译活性的丢失(见 V. A部分, 注意 2)。不要反复冻融反应预混液(TNT® T7 PCR Quick Master Mix)超过两次。

V. 转录/翻译步骤

以下是进行转录/翻译反应的通用指南。提供了用 $[\text{S}^{35}]$ 甲硫氨酸($[\text{S}^{35}]$ methionine, 放射性检测)、Transcend™非放射性反应体系(Transcend™ Non-Radioactive Detection Systems)及FluoroTect™ GreenLys 体外反应标记体系(FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System)进行的标准反应实例。在使用Transcend™体系时, 生物素化的赖氨酸残基在翻译反应中被结合到新生蛋白上。生物素化的赖氨酸残基以预荷电的 ξ -标记的生物素化赖氨酸tRNA复合物(Transcend™ tRNA)而非游离氨基酸的形式加入到转录/翻译反应体系中。在使用FluoroTect™体系时, 体外翻译通过一个标记有荧光BODIPY®-FL的荷电赖氨酸对翻译产物标记荧光。荧光赖氨酸是以 ξ -标记的荧光赖氨酸tRNA复合物(FluoroTect™ GreenLys tRNA)而非游离氨基酸的形式加入反应体系的。如欲获得有关FluoroTect™系统的更多信息请查阅技术手册Technical Bulletin #TB182, 如欲获得有关Transcend™系统的更多信息请查阅技术手册Technical Bulletin #TB285。这些文档可由Promega集团获得, 或直接登陆网站www.promega.com/tbs/获取。

V.A. TNT® T7 Quick for PCR DNA 反应的通用操作方案

用户需自行准备如下材料

•放射性氨基酸（用于放射性检测）、Transcend™ tRNA (Cat. # L5061) 和Transcend™ Colorimetric (Cat. # L5070) 或 Chemiluminescent (Cat. # L5080) Translation Detection Systems（用于非放射性检测），或结合FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System (L5001)的FluoroTect™ GreenLys tRNA。

1. 从-70℃取出试剂，用手温迅速融化TNT® T7 PCR Quick Master Mix，而后置于冰上；其他组分可于室温融化，之后置于冰上。
2. 按照如下举例混合各组分于0.5ml或1.5ml的微离心管中，在加完所有组分后，使用移液器(pipetting)轻轻混合。如需要可短暂离心以使反应液聚于管底部。如欲获得反应的更多信息参见注意事项 1 - 4。
3. 在实验中，我们建议预设一个不包括DNA模板的对照反应。其可以排除反应体系中标记氨基酸带来的背景。

注意：可提高Transcend™ tRNA的加入量（可达4 μl）以提高含较少赖氨酸及表达较差的蛋白的检测灵敏度。

组分	使用 Transcend™ tRNA 标准反应	使用 [³⁵ S]Met 标 准反应	使用 FluoroTect™ GreenLys tRNA反 应
TNT® T7 PCR Quick Master Mix (见下, 注意事项 3)	40 μl	40 μl	40 μl
PCR-generated DNA template(s) (见下, 注意事项 4)	2.5-5 μl	2.5-5 μl	2.5-5 μl
Met, 1mM (mix gently prior to use) (使用前轻轻混匀)	1 μl	—	1 μl
*[³⁵ S]Methionine (1,000Ci/mmol at 10mCi/ml) (见下, 注意事项 1)	—	1-4 μl	—
*Transcend™ Biotin-Lysyl-tRNA	1-2 μl	—	—
*FluoroTect™ GreenLys tRNA	—	—	1-2 μl
Nuclease-Free Water	补足 50 μl	补足 50 μl	补足 50 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

4. 30℃孵育反应60-90分钟。
5. 分析反应结果。确定放射性标记参入率（实验见VI.A部分）。然后对翻译产物进行SDS-PAGE分析（见VI.B部分）。

注意事项:

1. 当使用放射性氨基酸时，我们建议使用质量较好的 [³⁵S] 甲硫氨酸，如：PerkinElmer 的 EasyTag™ L-[³⁵S]methionine (PerkinElmer Cat.# NEG709A)，它不会产生兔网织红细胞裂解液中42kDa蛋白的背景标记，使用其它标记可能引起42kDa蛋白的背景标记^[5]。每50 μl 反应体系需要10 - 40 μCi (1 - 4 μl)的 [³⁵S]甲硫氨酸，至于具体用量取决于标记效率与成本之间的平衡。对于表达较好，且只包含几个甲硫氨酸的模板，10 μCi (1 μl)的 [³⁵S] 甲硫氨酸已足够用于表达检测。
2. 除了转录/翻译反应外，对TNT® Quick System组分的所有处理都应在4℃或冰上进行。在Master Mix融化使用后，应尽快将不使用的Master Mix冻存于液氮中以最好的保存Master Mix活性，使其在之后的再次使用中获得最好的效果。
3. 转录/翻译反应中应避免加入Ca²⁺，因为Ca²⁺可能再激活小球菌核酸酶 (micrococcal nuclease)，小球菌核酸酶用于降解Master Mix中内源RNA，降低翻译背景，一旦被再激活，会降解客户加入的DNA和RNA模板。
4. PCR产物可作为DNA模板在扩增反应后直接用于转录/翻译反应体系。我们建议在50 μl转录/翻译反应中使用2-5 μl未经纯化的PCR产物作为模板，最多加7 μl。对已经纯化的PCR产物，我们建议在50 μl转录/翻译反应中使用100-800ng。

VI. 蛋白翻译后分析

用户需自行准备如下材料

(溶液组成参见IX. A部分)

- 1M NaOH
- 25% TCA/2% 酪蛋白氨基酸 (Difco brand, Vitamin Assay Grade)
- 5% TCA
- Whatman GF/A 玻璃纤维滤器 (Whatman Cat.# 1820 021)
- 丙酮 (acetone)
- Whatman 3MM 滤纸
- 30% 丙烯酰胺溶液 (acrylamide solution)
- 4×分离胶溶液 (separating gel 4X buffer)
- 4×层积胶溶液 (stacking gel 4X buffer)

- SDS上样缓冲液 (SDS sample buffer)
- SDS聚丙烯酰胺凝胶 (SDS polyacrylamide gels)
- 可选: 预制聚丙烯酰胺凝胶 (precast polyacrylamide gels)

VI. A. 放射性标记参入百分率的确定

1. 从 50 μ l 反应体系中取 2 μ l 加入 98 μ l 1M NaOH/2% H₂O₂ 溶液中。
2. 振荡混匀。37°C 孵育 10 分钟。
3. 加 900 μ l 冰预冷的 25% TCA/2%酪蛋白氨基酸 (casamino acids) 以沉淀翻译产物, 冰上孵育 30 分钟。
4. 用少量预冷的 5%TCA 润湿一个 whatman® GF/A 玻璃纤维过滤器。真空过滤 250 μ l TCA 反应液收集沉淀的翻译产物。用 1-3ml 冰预冷的 5% TCA 冲洗滤器 3 次, 1-3ml 丙酮冲洗 1 次。室温或加热灯下干燥至少 10 分钟。
5. 为确定 ³⁵S 参入效率, 将滤器放于适量的闪烁混合物 (scintillation mixture) 中颠倒混匀, 用液体闪烁计数器 (liquid scintillation counter) 计数。
6. 为确定反应中总放射性标记参入率, 直接加 5 μ l TCA 反应液于滤器。干燥滤器 10 分钟, 按照步骤 5 用液体闪烁计数器计数。
7. 为确定背景数, 从无 DNA 模板的对照转录/翻译反应体系中取 2 μ l 反应液按步骤 1-5 进行处理。
8. 按下公式确定参入百分率 (percent incorporation)

$$\text{结合百分率} = \frac{\text{清洗滤器的每分钟闪烁数 (步骤5)}}{\text{未洗滤器的每分钟闪烁数 (步骤6)} \times 50} \times 100$$

$$\frac{\text{cpm of washed filter (Step 5)}}{\text{cpm of unwashed filter (Step 6)} \times 50} \times 100 = \text{percent incorporation}$$

9. 按下公式确定激发倍数 (fold stimulation)

$$\text{结合百分率} = \frac{\text{清洗滤器的每分钟闪烁数 (步骤5)}}{\text{无DNA对照反应滤器的每分钟闪烁数 (步骤7)}} \times 100$$

$$\frac{\text{cpm of washed filter (Step 5)}}{\text{cpm of "no DNA control reaction" filter (Step 7)}} = \text{fold stimulation}$$

VI. B. 翻译产物的变性胶分析

有关聚丙烯酰胺凝胶的准备及通过电泳对蛋白进行分离的信息请参见参考文献1。

预制的丙烯酰胺凝胶可从许多厂家获得。对于蛋白分析，Invitrogen Corporation 及 Bio-Rad Laboratories, Inc., 提供了许多种预制迷你胶，这些胶适合于厂商自身的垂直电泳和blotter系统 (vertical electrophoresis and blotter systems)。这些公司提供适用于分辨不同条件下及广谱范围大小的蛋白的Tris-Glycine, Tricine 及 Bis-Tris 胶。Invitrogen Novex® 4 - 20% Tris-甘氨酸梯度胶 (Cat. # EC6025 or EC60355) 与 Bio-Rad Ready Gel 4 - 20% Tris-Glycine Gel, 10-well (Cat. # 161-0903) 对于分辨广大分布的分子量范围的蛋白是极其方便的。此外，在方便性与安全性方面预制胶也提供了一致的结果。

1. 在50 μ l 的翻译反应完成后 (或者在任何希望的时间点停下)，取1-2 μ l 反应液加入20 μ l SDS样品缓冲液中，其余样品于-20°C保存。
2. 盖上管盖，100°C反应2min，以变性蛋白。在某些情况下，100°C变性会使蛋白聚集形成高分子蛋白复合物。此时可采用一个较低的温度 (如：可用80-85°C，3-4min；或70°C，10min或60°C，20min)。
3. 预冷的变性样品可加到SDS聚丙烯酰胺凝胶中，无需通过丙酮沉淀将标记多肽从游离氨基酸中分离。
4. 通常电泳按如下条件进行。积层胶 (stacking gel) 15mA，分离胶 (separating gel) 30mA (或梯度胶30mA) 电泳至溴酚蓝染料跑至胶底时停止。因溴酚蓝前包含非结合标记氨基酸，如果溴酚蓝染料未跑至底部，其上游未结合标记氨基酸可能更容易沉积。如做Western blotting或荧光成像 (phosphorimaging) 请转至步骤7。
5. 将聚丙烯酰胺凝胶放于塑料盒内，用固定液 (fixing solution, 按IX. A部分准备) 淹没胶表面于摇床上缓慢摇动30min，倒掉固定液。转到步骤6 (在胶片曝光前干胶)。

可选项：胶中标记蛋白可由放射自显影 (autoradiography) 或荧光X射线照相 (fluorography) 检测。荧光X射线照相极大地增加了³⁵S-、¹⁴C-、³H-标记蛋白的敏感性，因此我们推荐其用于体外翻译产物的分析。在胶中加入有机闪烁剂 (organic Scintillant) 可提高荧光检测灵敏度。闪烁剂通过改变同位素在可见光下的散射能 (emitted energy) 来增加X光芯片检测的能量比例。商品化试剂，如：Amplify™ Reagent ((GE Healthcare Bio-sciences) 可用来很好地增强荧光信号。胶样还可暴露于荧光成像屏。该系统有更好的灵敏度，以更迅速、更好的定量放射性条带。

6. 在X光片曝光前按如下操作干胶：用7%醋酸+7%甲醇+1%甘油混合液浸泡胶5min，以避免胶在干燥过程中断裂。将胶放于Whatman 3MM滤纸上，上覆塑料膜。真空下，使用胶干器，80°C干燥30-90min (要完全干燥)。也可使用Promega干胶试剂盒 (Cat. # V7120) 过夜干燥 (总的目的是使胶干燥不断裂)。将胶暴露于Kodak X-OMAT® AR 胶片，-70°C，1-6小时 (荧光自显影) 或室温6-15小时 (放射自显影)。

7. 蛋白的Western blot分析或荧光成像 (phosphorimaging) 分析: 从胶电转蛋白于硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane) 或PVDF膜上^[6,7]。对使用商品化电泳装置的电泳印记 (electrophoretic blotting) 实验的详细过程可参见参考文献6、8、9、10。对使用PVDF膜的Western blotting实验的全面讨论参见参考文献11。PVDF膜在使用转移缓冲液平衡前需用甲醇或乙醇预湿 (pre-wet), 印记可通过免疫监测分析或荧光成像检测到。更多信息请参见*Protocols and Applications Guide*在线版^[12]。

注意: 当通过荧光成像检测蛋白时, 将蛋白转移与膜上会凸显 (sharpen) 出条带。

VII. 常见问题

如有任何这里未涉及的问题请与当地Promega公司或经销商联系。

网址: www.promega.com. E-mail: techserv@promega.com

问题	原因及解决
蛋白产率低	<ul style="list-style-type: none"> ● Ca^{2+}可能出现在翻译反应中而激活了小球菌核酸酶, 导致裂解液中内源mRNA的破坏, 进而导致DNA与mRNA模板的降解。 ● 反应体系中有残留乙醇。PCR产物在纯化后不应有乙醇的残留。 ● 37°C 孵育反应会减少蛋白的产量, 请在30°C 进行反应。 ● 没有PCR产物。请通过电泳检测PCR产物是否被正确扩增, 如未扩出请参见II部分。
高分子量区出现非预期条带	<ul style="list-style-type: none"> ● 变性温度太高, 使得蛋白聚集形成高分子量蛋白复合物。降低变性温度。(如: 60–80°C 反应10–15分钟)
胶中出现非预期条带	<ul style="list-style-type: none"> ● 翻译产物蛋白的水解。添加蛋白酶抑制剂, 如: α-巨球蛋白 (α-macroglobulin)、亮肽素 (Leupeptin) 或糜蛋白酶抑制素 (chymostatin) (0.5–1 $\mu\text{g/ml}$)。 ● 多条条带从同一模板翻译出来。对翻译起始的遗漏扫描 (Leaky scanning) 可能导致模板内部的翻译起始。通过优化Mg^{2+}、K^+浓度可以提高翻译产物保真度^[13]。 ● 使用的^{35}SMet不适合翻译反应或35S过期失效, 有报道某些^{35}SMet产生42kDa的条带。推荐使用PerkinElmer EasyTag™ L-^{35}S-methionine (PerkinElmer Cat.# NEG709A) 以避免产生42kDa条带。 ● 球蛋白可能在放射自显影或染色胶中出现, 显示为一条10–15 kDa的弱弥散带。 ● 氨酰 tRNA可能产生背景条带 (~25kDa)。在翻译反应完成后, 加RNase A于反应液 (终浓度: 0.2mg/ml), 30°C 孵育5min以降解氨酰 tRNA。 ● β-巯基乙醇被氧化或loading Buffer中SDS不充足。使用包含2%SDS +100mM DTT的loading Buffer。
胶中有污斑	<ul style="list-style-type: none"> ● 胶不干净。在照相之前胶应该被洗。胶电泳完成后, 用标准Coomassie® 脱色液 (50%甲醇+7.5%冰醋酸) 或水浸润15–30min, 而后干燥。

- 蛋白上样量太多以致产生污斑。核查样品及loading buffer的上样量。
- 溶解蛋白的丙烯酰胺浓度太低。丙烯酰胺浓度能被加到12%。

VIII. 参考文献

1. Betz, N. (2000) Characterization of TNT® T7 Quick for PCR DNA. *Promega Notes* 77, 19 - 22.
2. Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196, 947 - 50.
3. Afshar-Kharghan, V. et al. (1999) Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood* 94, 186 - 91.
4. Innis, M.A. et al. (1990) *PCR Protocols*, Academic Press, Inc.
5. Jackson, R.J. and Hunt, T. (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Meth. Enzymol.* 96, 50 - 74.
6. Towbin, H. et al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350 - 4.
7. Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195 - 203.
8. Bittner, M. et al. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102, 459 - 71.
9. Towbin, H. and Gordon, J. (1984) Immunoblotting and dot immunobinding—current status and outlook. *J. Immunol. Methods* 72, 313 - 40.
10. Bers, G. and Garfin, D. (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *BioTechniques* 3, 276 - 88.
11. Hicks, D. et al. (1986) Immobilon™ PVDF Transfer Membrane: A new membrane substrate for Western blotting of proteins. *BioTechniques* 4, 272 - 82.
12. *Protocols and Applications Guide*, Online Edition (2004 - 2006) Promega Corporation.
13. Hurst, R. et al. (1996) The TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System. *Promega Notes* 58, 8 - 11.

IX. 附录

IX.A 溶液的配制

丙烯酰胺溶液, 30%

30g 丙烯酰胺
0.8g 双丙烯酰胺
加水至100ml, 4° C储藏。

10×SDS 聚丙烯酰胺电泳缓冲液

30g Tris base
144g 甘氨酸
100ml 10% SDS
加去离子水至1L, 室温储藏。

固定液

50% 甲醇
10% 冰醋酸
40% 水

1 X SDS上样缓冲液**1X SDS gel-loading buffer**

50mM Tris-HCl (pH 6.8)
2% SDS
0.1% 溴酚蓝
10% 甘油
100mM 二硫苏糖醇

没有二硫苏糖醇的1X SDS 上样缓冲液
可室温保存。在使用前添加 1 M二硫苏糖
醇储备液。

4×分离胶缓冲液

18.17g Tris base
4ml 10% SDS
加去离子水至约80ml，用12N HCl 调PH值至
8.8。而后加去离子水至100ml，室温储藏。

4×积层胶缓冲液

6.06g Tris base
4ml 10% SDS
加去离子水至约80ml，用12N HCl 调PH值至
6.8。而后加去离子水至100ml，室温储藏。